



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Endocrinologia

### **Terapia de Substituição Celular na Diabetes Tipo 1**

Diogo Reis Gomes

---

**JULHO'2018**



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Endocrinologia

### **Terapia de Substituição Celular na Diabetes Tipo 1**

Diogo Reis Gomes

**Orientado por:**

Dr.ª Ema Paula Lacerda Nobre Machado Caetano

---

**JULHO'2018**

## Resumo

A Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) é uma doença crónica, significativamente prevalente na Europa e América do Norte, cuja incidência global tem crescido cerca de 2,5-3% por ano. Trata-se de uma doença que resulta da destruição das células beta dos ilhéus pancreáticos, provocada na grande maioria dos casos por auto-imunidade mediada por linfócitos T. Devido aos importantes resultados do *Diabetes Control and Complications Trial*, actualmente o pilar do tratamento da DMT1 consiste num esquema intensivo de múltiplas injeções diárias de insulina. Existem formas lábeis da doença que se caracterizam por frequentes episódios de híper e hipoglicemia, apesar de instituído um esquema de insulina optimizado, que aumenta o risco de complicações e morte destes doentes.

O primeiro transplante de pâncreas foi efectuado em 1966, mas foi só com a introdução do protocolo de Edmonton, em 2000, que a terapia de substituição celular se tornou numa técnica viável. O protocolo de Edmonton para a transplantação de ilhéus foi revolucionário, na medida em que introduziu um esquema de imunossupressão livre de glucocorticóides e estabeleceu um processo rigoroso de isolamento e manipulação de ilhéus a transplantar. Desde então o processamento de enxertos e a imunossupressão foram optimizados, existindo investigação activa para criar esquemas imunossupressores que não usem inibidores da calcineurina. Outras frentes da investigação actual incluem a obtenção de células beta para transplantar a partir de células estaminais embrionárias, ou de células estaminais pluripotentes induzidas, bem como métodos de imunoisolamento do enxerto com tecnologias de encapsulamento, evitando métodos farmacológicos e seus efeitos adversos.

Actualmente estas técnicas têm resultados clínicos diminutos, com apenas uma fracção dos doentes a atingir a independência de insulina, apesar dos bons resultados no controlo dos episódios de hipoglicemia.

**Palavras Chave:** Diabetes Mellitus Tipo 1; Transplante; Ilhéus Pancreáticos.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

## Abstract

Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) is a chronic disease particularly prevalent in Europe and North America, which global incidence is increasing by 2,5-3% each year. It's caused by the destruction of the beta-cells of the pancreatic islets, mediated in most cases by T lymphocyte auto-immunity. The results of the *Diabetes Control and Complications Trial* established the intensive insulin treatment as the main component of the management of T1DM. There is a labile type of T1DM, characterized by frequent episodes of hyper and hypoglycaemia, despite optimal intensive insulin therapy, which carries a significant increase in the risk of death and complications of these patients.

The first pancreas transplantation was performed in 1966, but it was only with the introduction of the Edmonton protocol in 2000 that cell replacement therapy became viable. The Edmonton protocol was revolutionary because it introduced glucocorticoid-free immunosuppression and established a rigorous procedure for the isolation and manipulation of the islets for transplantation. Since then, the processing of grafts and the immunosuppression protocols were improved. There is active investigation going on for the development of calcineurin-inhibitor free immunosuppression protocols. Other present investigation topics include the production of cellular grafts from embryonary stem cells, or from induced pluripotent stem cells, as well as novel immunoisolation methods, such as encapsulation devices, in a way to avoid pharmacologic immunosuppression and its adverse effects.

In the present time, these therapies have unsatisfactory clinical outcomes, with only a fraction of the patients achieving insulin independence, despite the good results in preventing hypoglycaemia events.

**Keywords:** Type 1 Diabetes Mellitus; Transplantation; Pancreatic Islets.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

# Índice

<b>1. Introdução</b>	
<b>1.1</b> Epidemiologia: A incidência crescente da DMT1	6
<b>1.2</b> Fisiopatologia	7
<b>1.3</b> Tratamento Actual	8
<b>2. Terapia de substituição celular: pertinência e perspectiva cronológica</b>	10
<b>3. Fontes de células</b>	12
<b>4. Imunomodulação: Para além da imunossupressão farmacológica</b>	13
<b>5. Resultados clínicos</b>	15
<b>6. Conclusão</b>	17
<b>Bibliografia</b>	18

# 1. Introdução

## 1.1 – Epidemiologia: A incidência crescente da DMT1

A Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) é uma das mais comuns doenças crónicas na infância, bem como o tipo de diabetes mais prevalente nesta faixa etária <sup>[1]</sup>. Apesar de caracteristicamente diagnosticada na infância, um quarto dos casos são diagnosticados em adultos <sup>[2]</sup>.

Grande parte da informação relativa à epidemiologia infantil de DMT1 deriva do projecto DIAMOND iniciado pela Organização Mundial de Saúde em 1990 (Multinational Project for Childhood Diabetes - Diabetes Mondiale) <sup>[1]</sup>. O objectivo deste projecto foi apurar o impacto epidemiológico da DMT1 na infância, nomeadamente descrever a incidência mundial da doença na população com menos de 14 anos de idade <sup>[1]</sup>. No período de 1990-1999, a incidência de diabetes tipo 1 nesta população variou desde 0,1/100000 por ano na China e Venezuela até 40,9/100000 por ano na Finlândia <sup>[1]</sup>. De um modo geral, as incidências mais altas verificaram-se na Europa e na América do Norte e as mais baixas na Ásia, onde mais de 70% dos países reportam incidências <1/100000 por ano <sup>[1]</sup>. Verificou-se um aumento da incidência com o aumento da idade; Não houve diferença significativa da incidência entre os sexos masculino e feminino <sup>[1]</sup>. Em média verificou-se um aumento anual de 2,8% na incidência mundial de DMT1 nesta população, entre 1990-1999, o que vai de encontro a dados de estudos anteriores que apontavam para um aumento anual de incidência entre 2,5% a 3% <sup>[1]</sup>.

O aumento da incidência de DMT1 ao longo do tempo não parece poder ser explicado apenas por mudanças na susceptibilidade genética, daí se sugerir a coexistência de factores ambientais contribuintes para esta tendência, nomeadamente o aumento da obesidade infantil ou do stress psicológico na família que parece levar a um aumento dos marcadores de auto-imunidade relacionados com DMT1 em crianças com 1 ano de idade <sup>[1]</sup>.

Apesar de serem escassos os estudos epidemiológicos de DMT1 em ambos os grupos etários, a epidemiologia da DMT1 encontra-se menos estudada na população adulta. Uma revisão sistemática da literatura acerca da epidemiologia da DMT1 na população adulta, publicada em 2015, aponta para que exista uma correlação geográfica entre as incidências na população infantil e adulta <sup>[2]</sup>. Outro dado relevante, nela

apontado, é que, na população adulta, a incidência parece ser maior no sexo masculino do que no feminino, diferindo do que se verifica na infância <sup>[2]</sup>.

## 1.2 Fisiopatologia

A Diabetes Mellitus tipo 1 resulta da destruição das células beta dos ilhéus pancreáticos. A maioria dos doentes apresenta quer marcadores imunológicos de auto-imunidade contra os ilhéus, quer marcadores genéticos associados à doença, atribuindo-se o subtipo 1A (DMT1A) a este fenótipo de Diabetes Mellitus <sup>[3-4]</sup>. Uma fracção reduzida de doentes não apresenta nem os marcadores imunológicos indicativos de um processo auto-imune contra as células beta, nem os marcadores genéticos característicos da DMT1A, estes doentes parecem desenvolver o fenótipo clínico de DMT1 por mecanismos não autoimunes, sendo este o subtipo 1B da Diabetes Mellitus (DMT1B) <sup>[3-4]</sup>.

Indivíduos com susceptibilidade genética para desenvolver DMT1 parecem ter uma quantidade normal de células beta à nascença. Após um estímulo ambiental (infeccioso, por exemplo), é desencadeado um processo auto-imune, mantido e direccionado posteriormente a uma molécula específica das células beta <sup>[3]</sup>. Após o início deste processo, a massa de células beta começa a decrescer, apesar de a tolerância à glicose se manter normal numa fase inicial <sup>[3]</sup>. As características de DMT1 só se tornam evidentes após 70-80% das células beta serem destruídas, sendo que o ritmo de destruição varia grandemente entre doentes, entre meses a anos <sup>[3]</sup>.

Polimorfismos de múltiplos genes foram identificados como potenciadores do risco de desenvolver DMT1A (HLA-DQalfa; HLA DQbeta; HLA-DR; preproinsulina; PTPN22; CTLA-4; entre alguns outros) embora sejam os genes do complexo major de histocompatibilidade que têm o maior efeito <sup>[3-4]</sup>. A identificação de estímulos ambientais desencadeadores é difícil porque estes eventos podem preceder em vários anos o diagnóstico de DMT1. Hipoteticamente, o contacto com alguns vírus (*coxsackie*, rubéola, enterovírus), proteínas do leite de vaca ou factores relacionados com o período de gravidez e periparto podem ter algum papel no desenvolvimento da doença <sup>[3-4]</sup>.

Apesar de os outros tipos de células dos ilhéus pancreáticos serem embriologicamente e funcionalmente semelhantes às células beta e expressarem muitas das mesmas proteínas, estas são poupadas da destruição auto-imune <sup>[3]</sup>.

Nestes doentes estão presentes as seguintes características imunológicas:

- Auto-anticorpos contra células dos ilhéus (islet cell autoantibodies – ICA);
- Libertação de citocinas nos ilhéus;
- Linfócitos T que proliferam quando estimulados com proteínas dos ilhéus;
- Linfócitos activados nos ilhéus e nos gânglios linfáticos peripancreáticos;

O mecanismo exacto de destruição das células beta não é conhecido, sabe-se no entanto que estas são particularmente susceptíveis ao efeito de algumas citocinas (TNF-alfa; interferão gama e interleucina 1), que existe evidência de citotoxicidade por envolvimento directo de linfócitos T CD8+ e que o processo imune parece ser mediado por linfócitos T já que os ICA não reagem eficientemente com a superfície das células beta<sup>[3]</sup>.

Os ICA estão presentes em cerca de 85% dos indivíduos com DMT1 à data do diagnóstico, mas também numa minoria (5-10%) dos doentes com diagnóstico de DMT2<sup>[3]</sup>. Os ICA são compostos por vários anticorpos contra moléculas das células dos ilhéus (GAD, insulina, IA-2/ICA-512 e ZnT-8, principalmente) e são um marcador do processo auto-imune da DMT1A<sup>[3]</sup>. Curiosamente, a maioria destes antigénios não são específicos das células beta, apesar de estas serem as únicas destruídas, o que pode significar que estes não estão envolvidos na iniciação da destruição, mas que são secundários a esta<sup>[3-4]</sup>.

### 1.3 – Tratamento actual

A insulina é o pilar do tratamento da DMT1. Com o ensaio *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)*, tornou-se claro que um esquema terapêutico intensivo com múltiplas injeções diárias ou com infusão subcutânea continua de insulina (*continuous subcutaneous insulin infusion* – CSII) através de um dispositivo médico, juntamente com o acompanhamento de um equipa multidisciplinar de médicos, enfermeiros, dietistas e outros profissionais de saúde, melhorou significativamente quer o controlo glicémico, quer os *outcomes* a longo prazo<sup>[5-8]</sup>. Tanto as complicações microvasculares, macrovasculares como a mortalidade total foram reduzidas seguindo este esquema terapêutico<sup>[6-8]</sup>. Na altura do início do DCCT os tipos de insulina disponíveis eram apenas as insulinas humanas de curta e intermédia acção. Desde então,



foram concebidos análogos da insulina de rápida e de longa acção, que estão associados a menos episódios de hipoglicemia, menos aumento de peso e níveis de HbA1c inferiores quando comparados com as insulinas humanas <sup>[5]</sup>.

Os estudos que existem a comparar CSII versus terapia com múltiplas injeções diárias são de pequena dimensão e duração. Uma revisão sistemática aponta para que CSII permita melhor resultado na redução de HbA1c embora não se verifique diferença na frequência de hipoglicemia. Existe também alguma evidência de que a adição de dispositivos de monitorização contínua da glicemia a CSII também possa apresentar benefício na redução dos níveis de HbA1c, sem aumentar o risco de hipoglicemia <sup>[5; 9]</sup>.

Apesar de ser necessário estabelecer limites para os níveis de HbA1c e glicemia, é importante individualizar os objectivos terapêuticos de acordo com a duração da doença, idade e esperança de vida do doente, comorbilidades, presença de complicações macro ou microvasculares, consciência para a hipoglicemia e com as expectativas do doente <sup>[10]</sup>. A educação dos doentes para adequarem a dose de insulina à quantidade de glúcidos ingeridos, glicemia pré-prandial e actividade física prevista é essencial, sendo possível em alguns doentes a educação posterior para a contagem de gorduras e proteínas ingeridas optimizando assim o controlo da doença <sup>[10]</sup>.

A transplantação de pâncreas e ilhéus pancreáticos mostrou-se promissora na normalização do controlo glicémico mas é necessária terapêutica imunossupressora para o resto da vida do doente. Dados os potenciais efeitos adversos da imunossupressão, a transplantação deve ser reservada para os doentes com DMT1 que necessitem concomitantemente de transplante renal, ou que já tenham sido transplantados, ou para aqueles com episódios recorrentes de cetoacidose ou de hipoglicemia grave apesar de cumprirem esquema intensivo de controlo glicémico com insulina <sup>[5]</sup>.

## 2. Terapia de substituição celular: pertinência e perspectiva cronológica

Apesar de um tratamento otimizado com insulina, alguns doentes apresentam flutuações marcadas e imprevistas da glicemia, que põe em risco a sua vida. Esta forma lábil da doença afecta cerca de 3 em 1000 doentes com diagnóstico de DMT1 <sup>[11]</sup>. Neles são mais frequentes os episódios de hipo e hiperglicemia, de hipoglicemia despercebida (episódios de hipoglicemia grave sem sintomatologia alarmante) e de cetoacidose diabética <sup>[11]</sup>. As flutuações glicémicas destes doentes reduzem-lhes a qualidade de vida, aumentam a frequência e a duração das hospitalizações e potenciam um aumento das complicações da diabetes que lhes reduzem a esperança de vida <sup>[11]</sup>.

Mesmo com os avanços importantes no tratamento e acompanhamento multidisciplinar dos doentes com DMT1, estes ainda são insuficientes para alguns tipos de doentes como estes que apresentam uma forma lábil da doença. A terapia de substituição de células beta é promissora e uma esperança no tratamento de DMT1, como potencial método de substituição da função endócrina pancreática <sup>[12]</sup>.

O primeiro transplante pancreático, o procedimento precursor da terapia de substituição celular, ocorreu em 1966 efectuado pela equipa de Kelly *et al.* <sup>[13]</sup>. Desde então foram efectuados mais de 25000 transplantes pancreáticos no mundo inteiro <sup>[13]</sup>. No início, observa-se um rápido controlo da glicemia que levou mesmo à suspensão do tratamento com insulina por um curto período de tempo nos casos bem sucedidos, no entanto, acompanha-se de grande morbilidade relacionada com a própria cirurgia e da necessidade de imunossupressão para o resto da vida, com os seus efeitos secundários como a recorrência de diabetes <sup>[13]</sup>.

Em 1972 verificou-se que a transplantação de ilhéus pancreáticos curava a DM em ratos, mas foi só em 1989 que o primeiro transplante de ilhéus foi efectuado em contexto clínico humano <sup>[12]</sup>. Neste primeiro caso a independência de insulina apenas durou 1 mês devido à rejeição dos ilhéus transplantados por imunossupressão inadequada. Ao longo da década de 1990 as tentativas de um transplante de ilhéus bem sucedido continuaram mas os resultados mantiveram-se aquém do esperado com menos de 10% dos doentes a manter independência de insulina ao fim de 1 ano <sup>[12]</sup>.

Só com a introdução do Protocolo de Edmonton (PE) em 2000 é que a transplantação de ilhéus se tornou num tratamento potencialmente viável para doentes

com DMT1 <sup>[13]</sup>. Foram quatro as grandes diferenças deste em relação aos protocolos prévios de transplantação de ilhéus <sup>[13]</sup>:

- Seguir um esquema de imunossupressão sem glucocorticoides (que aumentam a resistência à insulina), a imunossupressão consistia em sirolimus, tacrolimus em baixa dose e daclizumab;
- Usar um número suficiente de ilhéus viáveis provenientes de múltiplos doadores (dois a quatro pâncreas), o que permitia uma maior probabilidade de independência de insulina após o transplante.
- Eliminar o uso de meios não humanos nos processos de isolamento e purificação de ilhéus de modo a evitar a exposição a xenoproteínas.
- Limitar o tempo de armazenamento em isquemia fria de modo a otimizar a função dos ilhéus, pois um tempo de armazenamento superior a 12 horas prejudica-a significativamente.

O PE foi determinante na história da transplantação de ilhéus, no entanto mostrou-se de difícil reprodução com as taxas de independência de insulina ao fim de um ano a variarem grandemente entre centros <sup>[11]</sup>. Este facto parece dever-se em parte à dificuldade de alguns centros em conseguirem os múltiplos pâncreas necessários e de se efectuar o transplante logo após o processo de purificação e isolamento devido a limitações técnicas neste processo, o mais complexo na preparação do enxerto <sup>[11]</sup>.

O procedimento de transplante de ilhéus é significativamente menos invasivo do que a transplantação total de pâncreas <sup>[11]</sup>. Os ilhéus, devidamente processados, são infundidos através de um cateter percutâneo transhepático guiado até à veia porta <sup>[11]</sup>. Os hospedeiros normalmente são submetidos a uma ou duas infusões dependendo da massa de ilhéus transplantados e do controlo glicémico/necessidades de insulina após a primeira infusão <sup>[11]</sup>. As complicações relacionadas com o procedimento de infusão podem ser quer a trombose da veia porta, quer o desenvolvimento de hipertensão portal <sup>[11]</sup>.

Apesar do enorme avanço que o protocolo de Edmonton representa, dados clínicos apontam para que 90% dos doentes a voltem à insulino-terapia ao fim de 5 anos <sup>[11,14]</sup>. Consequentemente o protocolo original foi modificado de modo a aumentar a eficácia e segurança do procedimento incluindo a diminuição das complicações relacionadas com a infusão <sup>[11]</sup>.

### 3. Fontes de células

De um modo geral, existem três fontes de células beta: alo, auto e xenoenxertos. A alo-transplantação de ilhéus mostrou resultados promissores como tratamento para DMT1, no entanto é grandemente limitada pela escassez de doadores, pelos desafios associados à imunossupressão e pela diminuição da massa celular do enxerto pós-transplantação <sup>[15]</sup>. Tudo isto leva a que, em contexto clínico, apenas possa ser recomendada a doentes com a forma lábil da DMT1 com episódios recorrentes de hipoglicemia ou doentes com doença renal crónica que necessitem de transplante renal <sup>[15]</sup> (cerca de 0,001% dos doentes com DMT1 <sup>[15, 16]</sup>).

Desde o estabelecimento do protocolo de Edmonton, os processos de purificação dos ilhéus e a preservação da massa de células melhoraram bastante, no entanto ainda se verifica uma perda de 60% dos ilhéus logo após a infusão intraportal (o procedimento mais comum de transplante) e um decréscimo acentuado destes ao longo do tempo <sup>[15]</sup>. O facto dos ilhéus transplantados não serem vascularizados é um factor determinante na hipóxia e deficiência de nutrientes que se verifica pós-transplantação que culmina na perda celular <sup>[15]</sup>. A falta de sangue circulante dentro dos próprios ilhéus determina uma deficiente detecção da glicemia circulante e libertação de insulina, quando comparados com a função dos ilhéus nativos <sup>[15]</sup>. Tudo isto culmina na necessidade de múltiplos doadores para um único transplante viável, o que limita por si a técnica.

O xenotransplante de células beta de porco já foi considerado pois são fisiologicamente semelhantes às células beta humanas e poderia ser um método de ultrapassar a escassez de enxertos humanos <sup>[17]</sup>. A utilização de xeno-enxerto suíno microencapsulado está a ser estudada em doentes humanos <sup>[17]</sup>.

Uma outra fonte alternativa de células beta, que teoricamente poderia servir um grande número de doentes com DMT1, seria a sua diferenciação a partir de células estaminais pluripotentes. Quer células estaminais embrionárias, quer células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC) têm potencial para se diferenciarem *in vitro* e gerarem grandes quantidades de células a serem transplantadas <sup>[15]</sup>. Para isto, são necessários métodos laboratoriais que se aproximem dos processos de diferenciação da vida embrionária e fetal. Na última década, foram desenvolvidos e aperfeiçoados protocolos para a diferenciação de progenitores pancreáticos a partir de células estaminais embrionárias e de iPSC, através de métodos laboratoriais que simulam quatro grandes passos da sua diferenciação natural <sup>[15]</sup>. Em 2014, dois laboratórios conseguiram a

diferenciação *in vitro* de uma célula beta-like com expressão monohormonal de insulina pela adição de três novos passos aos protocolos existentes <sup>[15, 18, 19]</sup>.

Verificou-se que iPSC provenientes de doentes com DMT1 parecem ser indistinguíveis das de pessoas sem a doença, o que aponta para que seja possível o auto-transplante <sup>[15]</sup>. No entanto, investigação recente sobre as iPSC mostrou algumas limitações à sua utilização, principalmente devidas à alteração da sua integridade genética (por mutações codificantes *de novo*) e epigenética (alterações dos padrões de metilação e consequentemente do *imprinting* genómico) <sup>[15]</sup>. Teoricamente, o auto-transplante poderia ser usado para minimizar a reacção imune ao enxerto, mas dada a natureza auto-imune da própria DMT1 ainda seria necessária alguma forma de imunossupressão <sup>[15]</sup>.

#### **4. Imunomodulação: Para além da imunossupressão farmacológica**

A administração de fármacos imunossupressores continua a ser o método mais praticado na prevenção da rejeição do enxerto, no transplante de ilhéus ou células beta <sup>[15, 20]</sup>. Actualmente é impossível evitar uma reacção imune ao enxerto transplantado, sem bloquear parte da função imunitária globalmente necessária à vida, daí que a terapêutica imunossupressora prolongada acarrete efeitos secundários significativos, como aumento do risco de neoplasias, de infecções oportunistas e até de disfunção de órgão, incluindo o próprio enxerto e o rim <sup>[15, 20]</sup>.

Os inibidores da calcineurina (principalmente o tacrolimus, usado em baixa dose no protocolo de Edmonton original e na maioria dos protocolos mais modernos) costumam fazer parte dos esquemas habituais de imunossupressão e sabe-se que estes têm um papel importante na toxicidade à célula beta e na disfunção renal pós-transplante <sup>[20]</sup>. A procura de agentes imunossupressores alternativos aos inibidores da calcineurina é uma área de investigação de grande importância, que não se limita à terapia de substituição celular na DMT1, mas sim à área da transplantação no seu todo <sup>[20]</sup>. Esquemas alternativos de imunossupressão que não incluam inibidores da calcineurina já foram testados. Foram conduzidos ensaios usando um anticorpo anti-LFA-1 (Efalizumab) e

um bloqueador CTLA-4 (Belatacept) <sup>[20, 21]</sup>. O Efalizumab foi, no entanto, retirado do mercado em 2009, mas o ensaio com o Belatacept mostrou resultados promissores com todos os cinco doentes incluídos a tornarem-se independentes de insulina após transplante, apesar de o período de *follow-up* curto (cerca de um ano) <sup>[21]</sup>.

A reacção alo-imune ao enxerto pós-transplante acontece quando as células apresentadoras de antígenos, quer do dador quer do hospedeiro, reconhecem o Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC ou HLA: *Human Leucocyte Antigen*) presente na superfície das células do enxerto, apresentando-o aos linfócitos T do hospedeiro <sup>[15]</sup>. Dado que enxertos derivados de células estaminais embrionárias humanas não vão conter células apresentadoras de antígenos e têm menor expressão de HLA, este tipo de enxerto poderá ser menos alo-imunogénico <sup>[15]</sup>. Outras formas de contornar a reacção imunitária estão em investigação: alteração genética do complexo HLA das células estaminais embrionárias/iPSC a transplantar de modo a criar um potencial dador universal <sup>[15]</sup> ou o transplante concomitante de células mesenquimatosas de modo a estabelecer tolerância imunitária ao enxerto <sup>[22]</sup>. Apesar de promissoras no controlo da alo-imunidade, não se sabe se terão o mesmo efeito na auto-imunidade que está na base da DMT1 <sup>[15]</sup>.

Outra linha de investigação está no desenvolvimento de sistemas de encapsulamento onde os ilhéus ou as células beta se encontrem imuno-isolados, quer através de um dispositivo semiporoso – macroencapsulamento – ou dentro de microesferas de polímero – microencapsulamento <sup>[15]</sup>. Existem múltiplos factores determinantes no desenvolvimento deste tipo de dispositivos: a sua composição incluindo a sua biocompatibilidade, estabilidade mecânica, tamanho dos poros e espessura, críticos para a difusão bilateral de pequenas moléculas (oxigénio, nutrientes, glicose, insulina e outras moléculas sinalizadoras) e bloqueio de células imunes e imunoglobulinas; a localização para o transplante - intraperitoneal ou subcutâneo – para melhor aceitação, vascularização, oxigenação e consequente sobrevivência do enxerto <sup>[15, 23]</sup>.

Existem vários dispositivos de macroencapsulamento em desenvolvimento que podem ser transplantados na região subcutânea facilitando o procedimento cirúrgico, a monitorização pós-transplante e a remoção cirúrgica deste <sup>[15]</sup>. Um destes dispositivos contém uma câmara de oxigénio que potenciou a sobrevivência dos ilhéus, sem reacção imune documentada – apontando para que a oxigenação é um factor determinante para o sucesso destes dispositivos <sup>[15, 23]</sup>.

Por outro lado, está a ser trabalhada o microencapsulamento, onde o enxerto é envolvido por um polímero de alginato, que teoricamente favorece a difusão, mas que ainda está longe de atingir a taxa de difusão óptima para a insulina, glicose, oxigénio e outros nutrientes enquanto ao que parece permite a passagem de algumas macromoléculas como imunoglobulinas <sup>[15]</sup>. Para além disto esta técnica requer uma transplantação intraperitoneal mais invasiva e que também parece comprometer a viabilidade a longo prazo deste dispositivo <sup>[15]</sup>.

## 5. Resultados clínicos

O *Collaborative Islet Transplant Registry* (CITR) emitiu o seu 9º relatório em 2016 contendo dados mundiais, provenientes de múltiplos centros de transplante, desde 1999 até 2013 <sup>[20, 24]</sup>. Nele estão registados 819 transplantes alogénicos de ilhéus em exclusivo, provenientes de 2032 dadores e 192 transplantes de ilhéus após/simultaneamente a transplante renal, provenientes de 389 dadores <sup>[20, 24]</sup>.

A taxa de independência de insulina (numa população muito heterogénea) é cerca de 50% ao fim de 1 anos e cai para cerca de 20% (no grupo de transplante renal concomitante) a 30% (no grupo de transplante isolado) ao fim de 5 anos <sup>[24]</sup>. São depois feitas várias análises de subgrupo, que mostram, por exemplo, melhores resultados para doentes com HbA1c de base mais baixa, com menor dose de insulina pré-transplante e para os esquemas de imunossupressão e métodos de manipulação dos enxertos mais recentes <sup>[24]</sup>.

Também se verifica que 60-70% dos doentes no CITR atingiram HbA1c inferior a 6,5%, ou uma descida de 2% do seu valor basal pré-transplante, ao fim de 1 ano e 40-50% ao fim de 5 anos <sup>[20, 24]</sup>. Outro dado interessante é que 80-90% dos doentes mantêm-se sem episódios de hipoglicemia grave ao fim de 5 anos pós-transplante <sup>[20, 24]</sup>. Este relatório permite ter uma ideia geral das tendências e dos resultados globais da transplantação de ilhéus, mas é preciso uma análise cuidadosa dos seus resultados dado que este não contém dados de todos os centros de transplantação e inclui populações heterogéneas, submetidas a técnicas variadas, de acordo com diferentes protocolos, ao longo de mais de uma década <sup>[20]</sup>.

Em 2016 foram publicados os resultados do primeiro ensaio clínico multicêntrico de fase 3, para transplantação de ilhéus em 48 doentes com DMT1

complicada por episódios graves de hipoglicemia <sup>[25]</sup>. Ao fim de um ano, 87,5% destes atingiram HbA1c <7% e não sofreram episódios de hipoglicemia, ao fim dos dois anos a percentagem desceu para 70,8%. A independência de insulina foi atingida por 52,1% dos doentes ao fim de um ano e 42% ao fim de dois anos <sup>[25]</sup>. Torna-se importante destacar que se perdeu o seguimento de 3 doentes ao fim de um ano e 8 ao fim de dois anos, o que pode influenciar negativamente a taxa de independência de insulina <sup>[25]</sup>. Este ensaio permitiu desenvolver e descrever um processo de produção de enxertos alogénicos de ilhéus obtidos a partir de pâncreas de dadores, reproduzível em múltiplos centros e eficazes no controlo da forma lábil de DMT1 <sup>[20, 25, 26]</sup>. Publicado em 2017, um estudo comparativo de CSII vs. transplante de ilhéus (todos os 10 doentes estudados progrediram de CSII para transplante), mostrou que o transplante parece melhorar os parâmetros glicémicos e reduzir a ocorrência de episódios de hipoglicemia ao fim de um ano <sup>[27]</sup>.

Já foram desenvolvidos múltiplos ensaios clínicos de fase 1 e 2 usando as tecnologias de micro e macroencapsulamento com enxertos produzidos a partir de órgãos de dadores, a partir de células estaminais ou até com xenoenxertos suínos <sup>[17, 28-30]</sup>. No entanto, as actuais tecnologias de encapsulamento não permitem uma boa adaptação ao local de enxerto nem boa vascularização, nutrição e oxigenação do enxerto, como tal, têm ainda resultados clínicos diminutos <sup>[20, 28-30]</sup>.

A independência de insulina é claramente o objectivo ideal da terapia mas isto não se reflecte nos *endpoints* primários dos vários estudos existentes para as diversas técnicas, que frequentemente são: redução da HbA1c, redução da dose de insulina, redução do número de episódios de hipoglicemia. Isto espelha tanto os resultados clínicos modestos destas técnicas, bem como o estado prematuro em que a sua aplicação clínica se encontra.



## 6. Conclusão

A ideia de se poder curar uma doença crónica, como a DMT1, é ambiciosa e sonhadora, mas os avanços científico-tecnológicos acumulados ao longo das últimas décadas mostraram-nos que pode ser possível. Conforme se pôde constatar, existem actualmente múltiplas frentes de investigação nesta área, desde a procura da melhor e mais eficiente fonte celular, ao melhor processo de manipulação dos enxertos, até à imunomodulação para a adaptação harmoniosa do enxerto ao organismo hospedeiro.

A pluralidade da investigação tem os seus benefícios, pois exploram-se os vários caminhos até uma cura, mas também tem inconvenientes. A convergência de esforços para concretizar estudos de desenvolvimento biotecnológico e clínicos mais robustos poderia ser benéfica, mas a sua concretização é de enorme complexidade no actual modelo mundial político-económico para a Saúde. Também não existem ensaios clínicos aleatorizados para estas terapias de substituição celular, certamente devido às dificuldades de desenho de estudo com um grupo de controlo, aos riscos actuais da intervenção relacionados quer com o procedimento de transplante, quer com a imunossupressão a longo prazo, mas também pelos resultados clínicos muito modestos dos estudos existentes actualmente, tudo isto somado levanta evidentes problemas éticos à sua concretização.

Apesar de tudo isto, o princípio persiste: o crescente conhecimento da fisiopatologia da DMT1, do desenvolvimento e fisiologia celular e tecidual, da manipulação genética, dos mecanismos da imunidade, das técnicas de imunomodulação e da biotecnologia vão certamente conduzir-nos ao melhoramento progressivo destas terapias.

## Bibliografia

1. The DIAMOND Project Group (2006) Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999. *Diabetic Medicine*, 23, 857–866.
2. Diaz-Valencia, P.A., Bougnères, P. and Valleron, A.-J. (2015) Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC public health* 15:255.
3. Powers, AC. Diabetes Mellitus: Diagnosis, Classification, and Pathophysiology. In: Kasper DL, et al. Ed. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill; 2015; 417:2403-2404
4. Pietropaolo M. (2018) Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. <https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-type-1-diabetes-mellitus>
5. American Diabetes Association, A.D. (2018) Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes care* 41:S73–S85.
6. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study Research Group, T.D.C. and C.T. (DCCT)/Epidemiology of D.I. and C. (EDIC) S.R. (2016) Mortality in Type 1 Diabetes in the DCCT/EDIC Versus the General Population. *Diabetes care* 39:1378–83.
7. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan, D.M., Genuth, S., Lachin, J., Cleary, P., Crofford, O., et al. (1993) The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine* 329:977–986.
8. Nathan, D.M., Cleary, P.A., Backlund, J.-Y.C., Genuth, S.M., Lachin, J.M., Orchard, T.J., et al. (2005) Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 353:2643–2653.
9. Yeh, H.-C., Brown, T.T., Maruthur, N., Ranasinghe, P., Berger, Z., Suh, Y.D., et al. (2012) Comparative Effectiveness and Safety of Methods of Insulin Delivery and Glucose Monitoring for Diabetes Mellitus. *Annals of Internal Medicine* 157:336.

10. Chiang, J.L., Kirkman, M.S., Laffel, L.M.B., Peters, A.L. and Type 1 Diabetes Sourcebook Authors (2014) Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes care* 37:2034–54.
11. Health Quality Ontario, H.Q. (2015) Pancreas Islet Transplantation for Patients With Type 1 Diabetes Mellitus: A Clinical Evidence Review. *Ontario health technology assessment series* 15:1–84.
12. Rekitke, N.E., Ang, M., Rawat, D., Khatri, R. and Linn, T. (2016) Regenerative Therapy of Type 1 Diabetes Mellitus: From Pancreatic Islet Transplantation to Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells international* 2016:3764681.
13. Vanikar, A. V., Trivedi, H.L. and Thakkar, U.G. (2016) Stem cell therapy emerging as the key player in treating type 1 diabetes mellitus. *Cytotherapy* 18:1077–1086.
14. Ryan, E.A., Paty, B.W., Senior, P.A., Bigam, D., Alfadhli, E., Kneteman, N.M., et al. (2005) Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54:2060–2069.
15. Aghazadeh, Y. and Nostro, M.C. (2017) Cell Therapy for Type 1 Diabetes: Current and Future Strategies. *Current Diabetes Reports* 17:37
16. Gruessner, A.C. and Gruessner, R.W.G. (2016) Pancreas Transplantation of US and Non-US Cases from 2005 to 2014 as Reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *The Review of Diabetic Studies* 13:35–58.
17. Open-label Investigation of the Safety and Effectiveness of DIABECCELL(R) in Patients With Type I Diabetes Mellitus - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00940173>
18. Pagliuca, F.W., Millman, J.R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J.H., et al. (2014) Generation of functional human pancreatic  $\beta$  cells in vitro. *Cell* 159:428–439.
19. Rezania, A., Bruin, J.E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., et al. (2014) Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology* 32:1121–1133.
20. Chang, C.A., Lawrence, M.C. and Naziruddin, B. (2017) Current issues in allogeneic islet transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* 22:437–443.
21. Posselt, A.M., Szot, G.L., Frassetto, L.A., Masharani, U., Tavakol, M., Amin, R., et al. (2010) Islet Transplantation in Type 1 Diabetic Patients Using Calcineurin

- Inhibitor-Free Immunosuppressive Protocols Based on T-Cell Adhesion or Costimulation Blockade. *Transplantation* 90:1595–1601.
22. Lilly, M.A., Davis, M.F., Fabie, J.E., Terhune, E.B. and Gallicano, G.I. (2016) Current stem cell based therapies in diabetes. *American journal of stem cells* 5:87–98.
  23. Barkai, U., Rotem, A. and de Vos, P. (2016) Survival of encapsulated islets: More than a membrane story. *World journal of transplantation* 6:69–90.
  24. Collaborative Islet Transplant Registry (2016) Collaborative Islet Transplant Registry: Ninth Annual Report. 2016.  
[https://citregistry.org/system/files/9AR\\_Report.pdf](https://citregistry.org/system/files/9AR_Report.pdf).
  25. Hering, B.J., Clarke, W.R., Bridges, N.D., Eggerman, T.L., Alejandro, R., Bellin, M.D., et al. (2016) Phase 3 Trial of Transplantation of Human Islets in Type 1 Diabetes Complicated by Severe Hypoglycemia. *Diabetes care* 39:1230–1240.
  26. Ricordi, C., Goldstein, J.S., Balamurugan, A.N., Szot, G.L., Kin, T., Liu, C., et al. (2016) National Institutes of Health-Sponsored Clinical Islet Transplantation Consortium Phase 3 Trial: Manufacture of a Complex Cellular Product at Eight Processing Facilities. *Diabetes* 65:3418–3428.
  27. Holmes-Walker, D.J., Gunton, J.E., Hawthorne, W., Payk, M., Anderson, P., Donath, S., et al. (2017) Islet Transplantation Provides Superior Glycemic Control With Less Hypoglycemia Compared With Continuous Subcutaneous Insulin Infusion or Multiple Daily Insulin Injections. *Transplantation* 101:1268–1275.
  28. Calafiore, R., Basta, G., Luca, G., Lemmi, A., Montanucci, M.P., Calabrese, G., et al. (2006) Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. *Diabetes care* 29:137–138.
  29. Tuch, B.E., Keogh, G.W., Williams, L.J., Wu, W., Foster, J.L., Vaithilingam, V., et al. (2009) Safety and viability of microencapsulated human islets transplanted into diabetic humans. *Diabetes care* 32:1887–1889.
  30. A Safety, Tolerability, and Efficacy Study of VC-02™ Combination Product in Subjects With Type 1 Diabetes Mellitus and Hypoglycemia Unawareness.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03163511>.